

発生部位に基づいたMSS (Microsatellite stable) 型大腸癌の臨床病理学的及び分子病理学的特徴の解析

著者	橋 弥生
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17153号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121943

発生部位に基づいた MSS (Microsatellite stable) 型大腸癌の
臨床病理学的及び分子病理学的特徴の解析

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科病態学講座 消化器外科学分野
高橋 弥生

目次

1. 要約

2. 研究背景

3. 研究目的

4. 研究方法

4-1. 対象

4-2. 検体採取と腺管分離法

4-3. DNA 抽出

4-4. PCR-MSI (Polymerase chain reaction-microsatellite instability) 解析

4-5. 変異解析

4-6. DNA メチル化解析

4-7. CNA (Copy Number Alteration) 解析

4-8. 統計解析

5. 研究結果

5-1. PCR-MSI 解析

5-2. MSS 型大腸癌の発生部位別の臨床病理学的特徴

5-3. MSS 型大腸癌の発生部位別の遺伝子変異

5-4. MSS 型大腸癌の発生部位別の DNA メチル化状態

5-5. MSS 型大腸癌の発生部位別の CNA

6. 考察

7. 結論

8. 謝辞

9. 引用文献

10. 図，および図の説明

1. 要約

大腸癌の分子病型は MSS (microsatellite stable) 型と MSI (Microsatellite instability) 型に大別され, 両者の発癌機序は排他的関係にあるとされている.

また, 大腸癌の発癌機序と発生部位との関連性も指摘されており, 実際 MSI 型は右側大腸に好発することがよく知られている. 一方 MSS 型大腸癌は左側のみならず右側にも発生し, MSI 型のような部位による差異は明らかにされていない. 本研究では大腸癌 92 例を用い, MSS 型を呈した 71 例 (右側癌 15 例, 左側癌 56 例) について変異解析 (*TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*), DNA メチル化解析 (高メチル化状態, 中メチル化状態, 低メチル化状態に分類), CNA (copy number alteration) (gain, loss に大別し後者は LOH と copy-neutral LOH に分類) 解析を行い, 発生部位による分子異常の特徴について検討した. 加えて CNA については CNA を示した各染色体上の DNA の長さの総和についても算出した. 変異解析では MSS 型右側癌に *KRAS* 変異の頻度が高く, MSS 型左側癌に *TP53* 変異の頻度が高かった. DNA メチル化解析では両群間とも中から低メチル化状態が多かった. CNA 解析では MSS 型左側癌で, gain が多数の染色体に高頻度に生じ, gain の長さが有意に長かった. また, MSS 型左側癌では 9q, 10q, 12q の gain の頻度が有意に高く, MSS 型右側癌では 3p, 16p の copy-neutral LOH の頻度が有意に高かった. MSS 型癌では発生部位により異なる分子異常を認め, 両群間の腫瘍発生の機序が異なることが示唆された.

2. 研究背景

大腸癌は罹患者数の世界第 3 位，死亡原因の世界第 4 位を占める罹患率と死亡率の高い疾患である¹．そのため大腸癌は最も重要な癌の一つとされ^{1,2}，近年では集学的治療の進歩が目覚ましい疾患の一つでもある．これらの進歩は大腸癌の発生機序の解明に基礎づけられており，大腸癌の分子異常を解明することは大腸癌の診断や治療の進歩に欠かすことのできない知見である．

現在，大腸癌にはいくつかの発癌仮説が確立され，各々の経路を経て進行する癌にはゲノムの不安定性が重要な役割を果たしている³⁻⁵．ゲノムの不安定性の観点から大腸癌を考えると，染色体レベルの異常である CIN (chromosomal instability：染色体不安定性) とゲノム内に散在性にみられるマイクロサテライト領域の異常である MIN (microsatellite instability：マイクロサテライト不安定性) に大別される³⁻⁵．大腸癌において，MSS (microsatellite stable：マイクロサテライト安定性) 型癌は CIN 型，MSI (microsatellite instability) 型癌は MIN 型と考えられており，両者は排他的関係にあるとされている^{3,6,7}．分子病型の違いから大腸癌を考えると，大腸癌の約 90% が MSS 型癌であり，その特徴は左側大腸に多く，DNA aneuploidy, LOH (loss of heterozygosity) の頻度が高く，*TP53* (*Tumor protein p53*)，*KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) 遺伝子変異の頻度が高いとされる．一方，残りの 10% が MSI 型癌と考えられており，その特徴は右側大腸癌に多く，DNA diploidy, *BRAF*

(*B-Raf protooncogene, serine / threonine kinase*) 遺伝子変異が高頻度とされる^{3-6, 8}.

このことから大腸癌の分子病型は **MSS** 型癌と **MSI** 型癌のいずれかに分類される。

大腸は発生や血管支配, 臨床病理学的特徴により, 近位大腸 (右側大腸) を盲腸から横行結腸脾弯曲部まで, 遠位大腸 (左側大腸) を横行結腸脾弯曲部から直腸までと定義されることが多く⁹⁻¹⁵, 右側発生と左側発生の大腸癌では異なる臨床病理学的及び分子生物学的特徴を示すことが報告されている⁹⁻¹⁷. 一方で, **MSS** 型癌と **MSI** 型癌をそれぞれ特徴づける分子異常は大腸癌の発生部位にも依存することが指摘されており, **MSI** 型大腸癌は右側に圧倒的に多い^{9, 11, 14}. これまで右側大腸癌は, 高齢の女性に多く, 充実型, 粘液癌などの組織学的特徴がみられ, 分子生物学的には, DNA diploidy, **MSI**, *BRAF* 遺伝子変異 の頻度が高く, **LOH** の頻度が低いことなどが報告されている^{9, 11, 13}. これらは前述の **MSI** 型癌の特徴を反映したものであり, 右側大腸癌の特徴は **MSI** 型大腸癌によって特徴づけられている. しかしながら, 右側大腸癌の **MSI** 型癌の頻度は一般に 30-40% とされており, 右側大腸癌においても **MSS** 型癌が主要な分子病型である⁹. すなわち, 右側大腸癌の 60-70% を占める **MSS** 型右側癌と左側大腸癌の 90% を占める **MSS** 型左側癌の違いについてはこれまで明らかにされていない. もし同じ分子病型を示すにも関わらず発生部位によって大腸癌の

発癌機序が異なっているのであれば、発生部位によって大腸癌の診断・治療が異なる可能性もあると思われる。

MSS 型癌では染色体レベルのゲノム異常が高頻度にかかることが特徴である。染色体レベルでゲノムワイドに発生している異常として近年では CNA が報告されている^{18, 19}。CNA にはコピー数の増加 (gain) とコピー数の減少があり、後者については LOH と copy-neutral LOH がある。Copy-neutral LOH はコピー数の変化を伴わないヘテロ接合性の消失と定義されている。食道癌では TP53 遺伝子座において LOH ではなく copy-neutral LOH が高頻度に認められたことから copy-neutral LOH が発癌の重要なメカニズムであることが示唆されている²⁰。従来、CNA の解析には Array CGH 法が用いられてきたが、copy-neutral LOH については Array CGH 法では同定できなかった。しかし、近年では SNP array 法を用いることで copy-neutral LOH を同定することが可能となった。LOH と copy-neutral LOH の違いを明確にすることは、大腸癌の発癌機序について新たな知見をもたらす可能性がある。

3. 研究目的

本研究は発生部位に基づき MSS 型大腸癌の臨床病理学的，分子病理学的特徴を明らかにすることを目的とした．

4. 研究方法

4-1. 対象

2013 年 4 月から 2015 年 10 月の間に岩手医科大学附属病院で外科的に切除された大腸癌 92 例（右側癌 31 例，左側癌 61 例）を用いた．家族歴を有する症例や術前に化学療法，化学放射線療法を施行した症例は除外した．また，腺管分離法による純粋な癌腺管のみを使用するため腺腫成分が混入する可能性がある早期大腸癌や，間質成分が混入する可能性がある低分化型腺癌は除き，進行癌および分化型管状腺癌を対象とした．本研究では，右側癌を盲腸から横行結腸脾弯曲部まで，左側癌を横行結腸脾弯曲部から直腸までと定義した⁹⁻¹⁵．なお，本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認（承認番号 HG H26-8）を得て実施された．

病理組織診断は消化管病理を専門とする病理専門医とともに大腸癌取り扱い規約第 8 版に準拠して行った²¹．臨床病理学的な検討項目には，年齢，性別，組織型，脈管侵襲の有無，進行度を用いた．進行度分類は UICC（Union for International Cancer Control）の TNM 分類を用いて行った²²．

4-2. 検体の採取と腺管分離法

手術切除された新鮮材料の腫瘍部と背景粘膜からそれぞれ 1 ヶ所ずつ

検体を採取した。腫瘍部は腫瘍中心近傍から 7x7 mm 大、背景粘膜は腫瘍から最も遠位の正常粘膜 5x20 mm 大の組織片を採取した。腺管分離法は、Arai らの方法に従って行った²³⁻²⁵。採取した粘膜片を剃刃でそれぞれ 2x2 mm 大に細切し、それらを pH 6.3, 30 mmol/l の EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid : エチレンジアミン四酢酸) を含む CMF-HBSS (calcium and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution : カルシウム, マグネシウムフリー Hanks 溶液) 20 ml にいれ 37°C で 60 分間加温, 振盪した。その後 1500 回転で 5 分間遠心分離し, 上澄みを捨て沈降した分離腺管と間質を含んだ組織片に CMF-HBSS を 20 ml 加え 30-40 分間攪拌し, 再び 1500 回転で 5 分間遠心分離した。上澄みを捨て 70% エタノールを加えて固定し DNA 抽出まで 4°C で保存した。分離した正常腺管および癌腺管の回収は実体顕微鏡 (SZ6, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて行った。回収した癌腺管および正常腺管をそれぞれ 10 腺管ずつパラフィン包埋し, 4μm 厚で薄切し HE (Hematoxylin-Eosin : ヘマトキシリン - エオジン) 染色組織標本を作製し, 間質細胞の混入のないことを確認した。

4-3. DNA 抽出

回収した正常腺管および癌腺管の各々からゲノム DNA を Phenol-Chloroform 抽出法を用いて抽出した²⁶。始めに回収した腺管を PBS

(phosphate buffered saline : リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄した後, 10% SDS (sodium dodecyl sulfate : ドデシル硫酸ナトリウム) と 20 mg/ml proteinase K を加え懸濁した. 室温で一晩穏やかに転倒混和した後, 中性飽和フェノール pH 7.5-8.0 を加え転倒混和し, 15000 回転で 5 分間遠心分離した. 上清を取り出しフェノール / クロロホルム (1 : 1) を加え転倒混和した後, 再び 15000 回転で 5 分間遠心分離した. 上層を取り出し 3M 酢酸ナトリウム pH 5.2 と 100% 冷エタノールを加え, ゆっくり重層させ -20°C で 1 時間安置した. 上清を捨て 80% 冷エタノールを加え, 再び 15000 回転で 5 分間遠心分離した後, 上清を捨て乾燥した. 最後に TE (Trishydroxymethyl-aminomethane-HCL-EDTA : トリス塩酸 EDTA, 組成 : 10mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA) 緩衝液を加え溶解させた. 抽出した DNA は吸光度測定法で DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) を測定し, アガロースゲル電気泳動にて DNA の状態も確認した.

4-4. PCR-MSI 解析

抽出した癌腺管および正常腺管の DNA について PCR-MSI 解析を行った. マイクロサテライトマーカー (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) を用いて²⁷, PCR (Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler, ABI) で増幅し, 自動シーケンサー (Geneteic Analyzer ABI PRISM-310, ABI) で解析した. PCR

増幅ステップを短縮するために AmpliTaq Gold PCR Master Mix を用いた。1 症例につき抽出した DNA 1 μ l, forward と reverse のプライマーを各々 0.3 μ l, AmpliTaq Gold PCR Master Mix 10 μ l, 純水 8.4 μ l, 計 20 μ l を調整し, PCR で増幅した。使用したプライマーは表 1 に示す。PCR の反応条件は, 初期活性化 94°C 10 分, 変性 94°C 30 秒, アニーリング 55°C 30 秒, 伸長反応 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。増幅した PCR 産物を自動シーケンサー (ABI PRIZM-310) を用いて PCR 産物のサイズを調べ, MSI の判定を行った。

判定基準は NCI (National Cancer Institute : 米国国立癌研究所) の基準を用い²⁷, 2 つ以上のマーカーが陽性のものを MSI-high 型, 1 つのマーカーが陽性のものを MSI-low 型, 全てのマーカーが陰性のものを MSI-negative 型とした。MSI-low 型と MSI-negative 型を区別し, MSI-negative 型のみを MSS 型とした²⁸。

4-5. 変異解析

抽出した癌腺管の DNA について変異解析を行った。KRAS (codon12, 13), BRAF (codon465, 468, 600) の解析は pyrosequence 法 (Epitect Bisulfite kit, PyroMark Q24, Qiagen NV) を用いて変異の有無を確認した。1 症例につき DNA

1 μ l, forward と reverse のプライマーを各々 1 μ l, PyroMark PCR Master Mix 12.5 μ l, 純水 9.5 μ l, 計 25 μ l を調整し, PCR で増幅した. プライマーは KRAS Pyro Kit, BRAF Pyro Kit (Qiagen) を用いた. PCR の反応条件は, 初期活性化 95°C 15 分, 変性 95°C 20 秒, アニール 53°C 30 秒, 伸長反応 72°C 20 秒を 1 サイクルとして 42 サイクル行った. 増幅した一本鎖の PCR 産物に sequencing プライマーをハイブリダイズした後, dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate : デオキシリボヌクレオチド三リン酸) をターゲット配列に対応する順序で 1 種類ずつ添加し, DNA Polymerase による塩基伸長反応を行った. 取り込まれたヌクレオチド量に比例した PPi (pyrophosphate : ピロリン酸) が遊離し, 遊離した PPi と反応した Sulfurylase が ATP を産生し, ATP が Luciferase 発光を触媒した. 発生した光は CCD (Charge-Coupled Device : 電荷結合素子) を用いて検出し, Pyrogram として観察された. 検出されたシグナルの高さは, 取り込まれたヌクレオチド数に比例し, PyroMark Q24 Software 2.0 を用いて解析し, 変異の有無については変異率が 15% 以上であったものを変異ありと判定した²⁹.

TP53 (exon5-8), *PIK3CA* (exon9, 20) の変異解析は SSCP (single strand conformation polymorphism) -direct sequence 法を用いて行った. 1 症例につき DNA 1 μ l, forward と reverse のプライマーを各々 1 μ l, *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* 12.5 μ l, 純水 9.5 μ l, 計 25 μ l を調整し, PCR で増幅した. 使用した

プライマーは表 2 に示した。反応条件は、初期活性化に 94°C 10 分、変性 94°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。PCR 産物の一部をホルムアミドの混合液に加え、熱変性してポリアクリルアミドゲル電気泳動し変異バンドを確認した。変異バンドが確認された症例の残りの PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、その泳動バンドをゲルから取り出し DNA を抽出、精製した^{26, 30}。その精製した DNA を *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (ABI) を用いて自動シーケンサー (ABI PRISM® 310) により塩基配列を同定し、変異の有無を同定した。

4-6. DNAメチル化解析

抽出した癌腺管および正常腺管の DNA についてメチル化解析を行った。各種癌関連遺伝子 (*LOX*, *MINT31*, *RUNX3*, *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1*) のプロモーター領域における DNA メチル化状態について bisulfite-pyrosequencing 法 (Epitect Bisulfite kit, PyroMark Q24, Qiagen) を用いて解析した。始めに Bisulfate 処理反応を行った。抽出した DNA と RNase フリー水を併せて 20 µl を入れ、これに溶解した Bisulfite Mix 85 µl と DNA Protect Buffer 35 µl を加え混和し、サーマルサイクラーを用いて非メチル化シトシンをウラシルに変換した。反応温度と時間は、変性 95°C 5 分、インキュベーション 60°C 25

分, 変性 95°C 5 分, インキュベーション 60°C 85 分, 変性 95°C 5 分, インキュベーション 60°C 175 分 で行った. Bisulfite 処理反応後, 変換 DNA の脱スルホン化及び精製を付属の DNA スピнкаラムで行い DNA を溶出した. 続く pyrosequencing 法は, 1 症例につき Bisulfite 変換した DNA 1 µl, forward と reverse のプライマーを各々 0.2 µl, PyroMark PCR Master Mix 12.5 µl, 付属の Coral Load Concentrate 2.5 µl, RNase フリー水 8.6 µl, 計 25 µl を調整し, PCR で増幅した. 使用したプライマーは表 3 に示した. 反応条件は, 初期活性化に 95°C 15 分, 変性 94°C 30 秒, アニール 56°C 30 秒, 伸長反応 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行った. 増幅した一本鎖の PCR 産物に sequencing プライマーをハイブリダイズした後 dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate : デオキシリボヌクレオチド三リン酸) をターゲット配列に対応する順序で 1 種類ずつ添加し DNA Polymerase による塩基伸長反応を行った. 取り込まれたヌクレオチド量に比例した PPi が遊離し, 遊離した PPi と反応した Sulfurylase が ATP を産生し, ATP が Luciferase 発光を触媒した. 発生した光は CCD を用いて検出し, Pyrogram として観察された. 検出されたシグナルの高さは, 取り込まれたヌクレオチド数に比例し, PyroMark Q24 Software 2.0 を用いて解析し, 各遺伝子のメチル化率 30% 以上をメチル化陽性とした⁸. メチル化状態は, Yagi らの 2 パネル法を用い HME (High-methylation epigenotype : 高

メチル化状態), IME (Intermediate-methylation epigenotype : 中等度メチル化状態), LME (low-methylation epigenotype : 低メチル化状態) に分類した^{31, 32}. 第 1 パネルに相当する *LOX*, *MINT31*, *RUNX3* のうち, 2 項目以上でメチル化陽性を示したものを HME 状態に分類し, 2 項目未満のものは第 2 パネルに相当する *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1* のうち, 2 項目以上でメチル化陽性を示したものは IME に分類した. また第 2 パネルで 1 項目以下のものは LME に分類した.

4-7. CNA 解析

抽出した癌腺管の DNA について CNA 解析を行った. DNA を 50 ng/ μ L に調整し, Illumina Human CytoSNP-12v2.1 Bead Chip (平均マーカージ間距離: 疾患領域 6 kbp, その他の染色体領域 10 kbp, プローブ数: 299,140 Illumina, Inc. San Diego, USA) を用い Illumina Infinium HD assay プロトコールに従い行った. BeadsChip データは iScan (Illumina) で読み込み GenomeStudio software (v.2011.1; Illumina) で解析した. GenomeStudio software で算出された LRR (log R ratio) と BAF (B allele frequency) を Illumina Karyostudio software program 1. 4. 3 (CNV Plugin v3. 0. 7. 0; Illumina) を用い解析し CNV Partition Algorithms (Illumina) を用いて gain, LOH, copy-neutral LOH に判定した. さらに, それらを各染色体

における CNA の頻度，各症例における CNA 領域の DNA サイズ (bp) の総和で評価した³³．各染色体における CNA の頻度については，Sawada, Sugai らの方法により，50% 以上の頻度を認めた遺伝子座を CNA 高頻度領域とした³³．

4-8. 統計解析

病理学的項目，MSI 解析，変異解析，DNA メチル化解析および CNA 解析について右側癌及び左側癌間の比較を行った．2 群間の統計学的有意差検定は χ^2 検定 (Yates の補正) を統計ソフト State Mate III for Windows Ver. 3.07 (Atom, Tokyo, Japan) を用いて行った．2 群間の罹患年齢は Mann-Whitney U 検定を PRISM6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った．*P* 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

5. 研究結果

5-1. PCR-MSI 解析

大腸癌 92 例中，MSI-high 型が 14 例（15.2%），MSI-low 型が 7 例（7.6%），MSS 型が 71 例（77.2%）であった．発生部位別の結果を表 4 に示す．以降の解析には MSS 型大腸癌 71 例を用いた．

5-2. MSS 型大腸癌の発生部位別の臨床病理学的特徴

MSS 型右側癌 15 例と MSS 型左側癌 56 例の臨床病理学的特徴を表 5 に示した．年齢の中央値は MSS 型右側癌が 76 歳（63 歳から 90 歳），MSS 型左側癌が 68 歳（39 歳から 87 歳）であり，MSS 型右側癌が MSS 型左側癌より罹患年齢が高かった（ $P = 0.01$ ）．MSS 型右側癌は左側癌よりも女性の割合が高い傾向を認めたが有意な差はみられなかった．組織型，リンパ管・静脈侵襲の程度，TNM Stage は両群間に差を認めなかった．

5-3. MSS 型大腸癌の発生部位別の遺伝子変異

MSS 型大腸癌における発生部位別の変異解析結果を表 6 に示す．TP53 変異の頻度は MSS 型右側癌（3 / 15 例，20.0%）と比較して MSS 型左側癌（33 / 56 例，58.9%）で有意に高かった（ $P = 0.006$ ）．一方，KRAS 変異の頻度は MSS

型右側癌（11 / 15 例 73.3%）が MSS 型左側癌（16 / 56 例, 28.6%）よりも有意に高かった（ $P = 0.001$ ）。*BRAF* および *PIK3CA* の変異の頻度に両群間で差は認められなかった。

5-4. MSS 型大腸癌の発生部位別の DNA メチル化状態

MSS 型大腸癌における DNA メチル化状態の解析結果を表 7 に示す。HME, IME, LME は MSS 型右側癌ではそれぞれ 0 例 (0%), 11 例 (73.3%), 4 例 (26.7%), MSS 型左側癌では 3 例 (5.3%), 28 例 (50.0%), 25 例 (44.7%) に認められ, 両群ともに IME, LME の頻度が高く, HME の頻度は低かった。両群間の比較では DNA メチル化状態の差異は認めなかった。

5-5. MSS 型大腸癌の発生部位別の CNA

5-5-1. CNA の出現頻度の比較

各染色体における CNA の出現頻度を図 1-1, 1-2 に示す。CNA が出現していた染色体の遺伝子座は MSS 型右側癌では 28 箇所から 585 箇所（中央値 219 箇所）に認められ, その内訳は gain が 1 箇所から 384 箇所（中央値 150 箇所）, LOH が 0 から 99 箇所（中央値 30 箇所）, copy-neutral LOH が 0 から 282 箇所（中央値 42 箇所）であった。一方, MSS 型左側癌では CNA が

出現していた染色体の遺伝子座は 78 箇所から 730 箇所（中央値 447 箇所）に認められ、その内訳は gain が 64 箇所から 568 箇所（中央値 280 箇所），LOH が 0 から 184 箇所（中央値 53 箇所），copy-neutral LOH が 0 から 292 箇所（中央値 57 箇所）であった。

高頻度に gain, LOH, copy-neutral LOH が認められた遺伝子座を表 8 に示す。高頻度（50%以上）に gain が認められた遺伝子座は MSS 型右側癌では 13q12.13-12.3, 20q13.33, 7p21.1-21.2, 7q31.33, 8q11.21-13.3, 13q12.11-12, 20q11.21-13.32, MSS 型左側癌では 8p11.1-11.23, 8q, 20p, 20q, 13q, 7p, 7q11-21.11, 7q21.12-36.3 であった。高頻度（50% 以上）に LOH が認められた領域は、MSS 型右側癌では 18q21.1-22.3, 18q11.2-12.3, 18p11.21-32, MSS 型左側癌では 8p12-23.1, 17p11.2-13.1, 18p, 18q であった。Copy-neutral LOH は右側および左側のいずれにおいても高頻度の異常は認められなかった。

5-5-2. CNA の出現頻度が異なる遺伝子座の比較

発生部位によって CNA の出現頻度に有意差がみられた遺伝子座を表 9 に示す。MSS 型右側癌では 3p24.2, 3p24.3, 16p12.1 および 16p13.2 において 20% 以上で copy-neutral LOH を示し、MSS 型左側癌よりも MSS 型右側癌においてその頻度は有意に高かった ($P = 0.01$, $P = 0.02$, $P = 0.04$, $P = 0.04$)。MSS

型左側癌では10q21.1, 10q21.3, 12q14.1, 12q14.2, 9q21.11, 9q21.12, 9q21.33, 9q22.1, 9q22.31, 9q22.32 において 30% 以上で gain を示し, MSS 型右側癌よりも MSS 型左側癌においてその頻度は有意に高かった ($P = 0.03$, $P = 0.03$, $P = 0.03$, $P = 0.03$, $P = 0.04$, $P = 0.04$, $P = 0.04$, $P = 0.04$). LOH には左右差を示す遺伝子座はみられなかった.

5-5-3. CNA 領域における DNA サイズの総和の比較

MSS 型右側癌と MSS 型左側癌における CNA 領域の DNA サイズの総和を図 2 に示す. Gain, LOH および copy-neutral LOH を合わせた全 CNA 領域, overall の DNA サイズ (bp) の総和 (中央値) は, MSS 型右側癌では 0.7×10^9 bp, MSS 型左側癌では 1.5×10^9 bp であり, 左側癌で有意に大きかった ($P = 0.03$). 特に gain の総和は左右で有意差を認め, 全染色体領域の gain の総和 (中央値) は MSS 型右側癌では 0.5×10^9 bp, MSS 型左側癌では 0.9×10^9 bp であり, 左側癌で有意に大きかった ($P = 0.02$). Loss (LOH と copy-neutral LOH) については左右差を認めなかった.

MSS 型右側癌あるいは MSS 型左側癌の特徴を有する代表的症例をそれぞれ図 3, 図 4 に示した.

6. 考察

これまで数多くの研究により発生部位に基づく大腸癌の分子異常の違いが報告されてきた。右側大腸癌は、高齢の女性に多く、充実型、粘液癌などの臨床病理学的特徴がみられ、分子病理学的には DNA diploidy, MSI- high 型, HME の頻度が高い。一方、左側大腸癌は組織像が多彩であり臨床病理学的な特徴は乏しいとされ、分子病理学的には MSS 型, DNA aneuploidy の頻度が高いことが報告されている⁹⁻¹⁷。MSS 型大腸癌は、左側のみならず右側においても主要な分子病型であるが、発生部位に基づいた MSS 型癌の差異については、MSI 型癌を検討した Zhao らの報告の一部で MSS 型癌について触れられているのみであり³⁴、臨床病理学的特徴や分子病理学的特徴については十分に明らかとなっていない。発生部位によって大腸癌の発癌機序が異なるのであれば、その違いに基づいた大腸癌の診断・治療が今後提案される可能性もある。MSS 型癌における右側癌と左側癌の分子機序の違いを明らかにすることは、大腸癌の基礎的理解に貢献するばかりではなく、大腸癌の治療が発生部位に基づいて行われる可能性があり、大腸癌の診断に核心的な影響を与える可能性もある。

本研究では、検体の採取方法として腺管分離法を用いた。近年の研究では間質細胞にも様々な分子異常があることが報告されており³⁵、正確な癌細胞のみの分子解析を行うためには、腫瘍組織から癌腺管と間質を完全に分離し、純粋

な癌腺管（腫瘍細胞）を単離することが不可欠である．腺管分離法を用いたことにより極めて精度の高い分子解析結果が得られたと考える．その一方で、腺管分離が困難な非充実型の低分化型腺癌の症例は含まれず、低分化型腺癌が一部にある症例では主成分である分化型管状腺癌が主に採取されている可能性がある．また、炎症細胞の影響については、腺管分離法を行い回収した単離腺管のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した際に、間質の炎症細胞が完全に除去されていることが確認されており本研究には影響しないと考える．

本研究では腫瘍中心部が最も分子異常が蓄積していると仮定し、検体採取部位を腫瘍中心部近傍とした．大腸癌の腫瘍内の *heterogeneity* については Uchi らが、発癌、進展には無数の遺伝子変異が生じており、同一腫瘍内でも部位により異なる遺伝子変異が生じていることを報告している³⁶．腫瘍の分子異常を代表している部分を画一的に確定することは困難であるが、腫瘍の先進部において分子異常の蓄積が進行していることは *tumor budding* や癌の微小環境などからも十分に推定できる．従って私は、癌の先進部を癌の分子異常の代表領域としてこの領域を含む腫瘍中心部近傍より検体採取を行うことについては十分な合理性があるものと考えている．

MSS 型大腸癌 71 例の臨床病理学的特徴を解析したところ、右側発生、左側発生の両群とも性別、組織型、脈管侵襲、病期分類に差はなかったが、年齢

は MSS 型右側癌が左側癌に比べて有意に高齢であった。Arai らは右側癌の比率が高齢になるほど増加することを報告しており³⁷、本研究において年齢に有意差が指摘できたことは右側癌の発生が年齢と関連していることを表していると考えている。本研究では年齢以外で臨床病理学的な差異を指摘できなかったが、組織学的な検討については今後の多数例を用いた検討が必要と思われる。

TP53 変異はヒトがんの中で最も高頻度に見られる遺伝子異常で、約 50% が変異しているとされている^{4, 5, 38}。大腸癌では 60-80% と高頻度に変異が生じており^{4-6, 38}、近年の研究では右側大腸癌より左側大腸癌に TP53 の変異が多くみられるとの報告がある^{11, 39}。今回の研究では MSS 型左側癌に TP53 変異が多くみられ、MSS 型右側癌は左側癌と比較して有意にその頻度が少なかった。このことは左側発生と TP53 変異との密接な関連を示唆するものであり、癌発生における TP53 変異の中心的役割から考えて、MSS 型左側癌と MSS 型右側癌の発癌機序の違いが示唆される結果と思われた。一般的に大腸癌では TP53 の変異は腺腫から早期癌の発癌段階に起こると考えられている^{6, 8}。今回の結果より腺腫から早期癌への発癌機序が MSS 癌では発生部位により異なることが示唆された。

一方、KRAS 変異は発癌の低異型度腺腫から高異型度腺腫の段階に影響しているとされている^{4, 6, 8, 38}。細胞膜上に存在する EGFR (epidermal growth factor

receptor：上皮成長因子受容体）が活性化されると，下流に存在する RAS / RAF / MAPK 経路, PI3K / AKT / mTOR 経路へシグナルを伝達し細胞の増殖が促進される．大腸癌では EGFR が過剰発現しており癌の進行に主要な役割を担っていることが報告されている．近年，抗 EGFR 抗体薬が大腸癌の重要な治療の一つとなっている．KRAS は EGFR からの増殖シグナルを下流の MAPK に伝達する役割を担っているため，抗 EGFR 抗体薬の使用を決めるうえで 変異の有無が重要となっている⁴⁰．KRAS 変異は大腸癌の約 30-50% に認め，KRAS 変異の野生型では抗 EGFR 抗体薬の効果が期待できるとされている^{38, 40, 41}．既知の報告と同様に^{42, 43}，今回の研究では MSS 型癌において KRAS 変異が右側癌に有意に多く，左側癌では KRAS 変異が少なかった．つまり MSS 型左側癌は KRAS 変異の野生型が多く，抗 EGFR 抗体薬の対象病変となる可能性があるものと思われる．即ち，MSS 型癌では発生部位により分子標的治療の選択が異なることが示唆される．

ゲノムワイドな DNA メチル化異常は癌関連遺伝子の不活化機構として知られ，大腸癌においてこのエピジェネティックな機構は発癌に重要な役割を担っている^{44, 45}．Yagi, Kaneda らは 2 パネル法を用いて大腸癌が 3 つの DNA メチル化エピジェノタイプに分類されることを報告している^{31, 32}．HME 群は Toyota らの CIMP (CpG island methylator phenotype) 陽性に相当し^{31, 32, 44, 45}，

MSI で *BRAF* 変異陽性の大腸癌と強く相関する^{4, 5, 46}. 一方, MSS 型癌の CIMP は明らかにはなっていない. 本研究では, MSS 型癌では発生部位に関わらず IME や LME が多く HME はほとんど認められなかった. Kaneda らは大腸癌の前癌病変である大腸腺腫において DNA メチル化解析を行い, メチル化異常の蓄積が大腸腺腫の段階で完成していることを報告している^{31, 32}. 以上より MSS 型癌の腺腫を介した発癌経路の場合は, メチル化異常の蓄積が生じる大腸腺腫の段階, すなわち前癌病変の段階ではメチル化を介したエピジェネティックな機構に左右の違いがないことを示していると考えられた.

これまで発生部位に基づいた MSS 型大腸癌の CNA の相違について言及した報告は認められない. 今回行った CNA 解析では, MSS 型癌は発生部位によって CNA が出現する遺伝子座が異なることが明らかとなった. MSS 型左側癌は 9q21-22, 10q21.1-21.3, 12q14.1-14.2 の gain が高頻度で ($P = 0.04$, $P = 0.03$, $P = 0.03$), MSS 型右側癌では 3p24.2, 3p24.3, 16p12.1-13.2 の copy-neutral LOH の頻度が高いことから ($P = 0.01$, $P = 0.02$, $P = 0.04$), これらの遺伝子座に存在する各々のコピー数の異常が発生部位による MSS 癌の発癌機序の相違に重要な役割を示しているものと考えられた.

CNA 解析で明らかとなった MSS 型左側癌に関連する 9q21-22, 10q21.1-21.3, 12q14.1-14.2 および MSS 型右側癌に関連する 3p24.2-24.3,

16p12.1-13.2 には、大腸癌の発癌に関わる候補遺伝子が多数存在していた。その中でも大腸癌の発癌機序に重要な役割を果たすと考えられる *CDK* (*cyclin-dependent kinase*) 4/6 が 12q14.1-14.2 に^{47,48}, *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*) が 9q21-22 に⁴⁹, *RARβ2* (*retinoic acid receptor β2*)⁵⁰, *TOP2B* (*topoisomerase IIbeta*)⁵¹ が 3p24 に認められた。特に 12q14.1-14.2 に位置する *CDK4* と *CDK6* は細胞周期の G₁ 期から S 期への移行を促進している。増殖刺激により合成された G₁ サイクリンである D-type のサイクリン (D1, D2, D3) と *CDK4/6* の複合体は、核内へ移行し Rb (Retinoblastoma) タンパク質をリン酸化し、その結果 E2F の転写活性化能を誘導し細胞周期を S 期へともたらし、癌細胞はサイクリン D, *CDK4/6* が過剰に活性化することにより S 期の進行が亢進し、細胞周期が制御できずに増殖能を亢進させる。癌細胞の増殖にはサイクリン D および *CDK4/6* が重要な役割を果たすことが知られている^{46,47}。最近の遺伝子改変マウスモデルを用いた研究では、非小細胞肺癌マウスにおける *KRAS* 変異と *CDK4* との相関が報告されている⁵²。また、*NRAS* 変異を有する悪性黒色腫マウスでは、*NRAS* 経路の下流に存在する MEK 阻害薬と *CDK4* 阻害薬との併用によってより高い治療効果が得られたことが示されている⁵³。Cole らは大腸腫瘍発生の早期に生じる *APC* 遺伝子の不活化がサイクリン D2 の合成を促し、*CDK4/6* の発現を増加させ Rb タンパク質の過剰なリン

酸化を引き起こすことを報告した⁵⁴。加えて、Ziemke らは *KRAS* のシグナル経路が過剰に活性化している大腸癌に対して MEK 阻害薬と CDK4 阻害薬の併用が新しい分子標的治療となりうることを報告している⁴⁷。本研究では、MSS 型左側癌は *CDK4/6* が位置する 12q14.1-14.2 の gain が高頻度に認められた。この結果より、*CDK4/6* の発現が癌細胞の増殖を亢進していると考えられ、CDK4 阻害薬による分子標的治療は左側癌に対して効果を示す可能性が示唆された。今後、*CDK4/6* 遺伝子の RNA から RT-PCR (reverse transcription-PCR) 法を用いて complementary DNA (cDNA) の定量を行うことや CDK4/6 蛋白の免疫組織化学染色での発現の確認が必要であると考ええる。

3p24 に位置する *RARβ2* 遺伝子は癌抑制遺伝子で、様々な癌種で LOH が高頻度にみられ *RARβ2* の不活化が起こることが報告されている⁵⁰。癌が進行する際の *RARβ2* 遺伝子発現の低下は腫瘍形成と retinoid 耐性の獲得に関与し、*RARβ2* 遺伝子の発現が腫瘍発生を抑制する可能性が示されている。実際、Perraud らは *RARβ2* 遺伝子が治療効果や予後を予測する指標になりうることを報告した⁵⁰。本研究では、MSS 型左側癌と比較して MSS 型右側癌では *RARβ2* 遺伝子の位置する 3p24 の copy-neutral LOH が高頻度に認められた。Copy-neutral LOH の意義については、Saeki らが食道癌において *TP53* 遺伝子座の copy neutral LOH がゲノムの不安定性を引き起こし発癌の重要なメカニズム

であることを報告しており²⁰，本研究では *RARβ2* 遺伝子座の copy neutral LOH がゲノムの不安定性を引き起こし *RARβ2* 遺伝子の発現が低下し癌の進行に關与している可能性が考えられた．今後 RT-PCR 法を用い *RARβ2* 遺伝子の RNA より cDNA の定量を行うことや *RARβ2* 蛋白の免疫組織化学染色での発現の確認が必要であると考ええる。

大腸癌の約 90% は MSS 型，言い換えると CIN 型である^{4,6}．CIN とは染色体間の転位や転座，一部の欠失，さらには染色体数の増減を表す染色体の構造異常により特徴づけられており，その結果，核型の多様性が生じ，染色体の aneuploidy や LOH などゲノムの不安定性を引き起こす⁷．本研究では，CNA の蓄積をその領域の DNA サイズの総和として評価し，gain, LOH, copy-neutral LOH の各々とそれらを合わせた overall に分けて検討した．Loss

(LOH と copy neutral LOH) については MSS 型右側癌，MSS 型左側癌ともに DNA サイズが小さく差を認めないものの，overall と gain については右側癌よりも有意に左側癌の DNA サイズが大きく CNA が蓄積していた．Raskov らは *TP53* が DNA 複製のエラーが生じた際に，細胞周期の G₁ 期から S 期への調節や DNA 修復をすることでゲノムの安定性を保持する役割を担っていると報告している⁵⁵．すなわち，*TP53* の変異が生じると細胞周期の調節や DNA 修復が行われずゲノムの安定性を保持することが困難となる．本研究では，MSS 型左

側癌に *TP53* 変異が多くみられ，加えて CNA が多く蓄積していることから，*TP53* の変異がゲノムの不安定性を高率に引き起こしている可能性もあると思われた．

7. 結論

本研究は、腺管分離法を用いて発生部位に基づいた MSS 型大腸癌の臨床病理学的、分子病理学的特徴について検討した。右側発生と左側発生 of MSS 型大腸癌は組織学的な観点からは大きな差異はみられなかったが、分子異常の観点からは異なるものであった。変異解析では、右側癌には *KRAS* 変異が、左側癌には *TP53* 変異が高頻度に認められた。DNA メチル化状態については発生部位に関わらず IME と LME が多かった。また、CNA 解析では CNA の出現頻度に差がみられた遺伝子座は左右で異なっており、CNA 領域の DNA サイズの総和から、左側癌では染色体の異常 (overall, gain) がより多く蓄積していた。

以上、これまで明らかではなかった MSS 型大腸癌の発生部位による違いについて検討した。MSS 型大腸癌は発生部位により異なる分子異常を認め、両群間の腫瘍発生の機序が異なることが示唆された。本研究は、発生部位に基づいて大腸癌の分子病型の違いを明らかにし、大腸癌の腫瘍発生の理解をより深めるものと考えられた。

8. 謝辞

本研究及び学位論文作成にあたり御指導，御鞭撻を賜りました岩手医科大学医学部病理診断学講座の菅井有教授，石田和之准教授，上杉憲幸先生ならびに諸先生方に深甚なる感謝の意を表します．また，このような研究の機会を与えていただいた東北大学医学系研究科外科病態学講座消化器外科学分野の海野倫明教授，森川孝則先生，同生体調節外科学分野の唐澤秀明先生に深謝致します．さらに，本研究を進めるにあたり検体採取に御協力いただきました岩手医科大学医学部外科学講座の佐々木章教授，大塚幸喜先生，組織標本作製や遺伝子解析に御指導，御協力いただきました岩手医科大学附属病院病理診断科及び医学部病理診断学講座遺伝子解析室の臨床検査技師の皆様に心より感謝申し上げます．

9. 文献

- [1] Hagggar FA, Boushey RP: Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009, 22:191-7.
- [2] Herszenyi L, Tulassay Z: Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010, 14:249-58.
- [3] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. Nature 1997, 386:623-7.
- [4] Ogino S, Goel A: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. J Mol Diagn 2008, 10:13-27.
- [5] Cancer Genome Atlas N: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012, 487:330-7.
- [6] Jass JR, Whitehall VL, Young J, et al : Emerging concepts in colorectal neoplasia. Gastroenterology 2002, 123:862-76.
- [7] Pino MS, Chung DC: The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology 2010, 138:2059-72.
- [8] Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, et al : Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. Am J Pathol 2012, 181:1847-61.
- [9] Iacopetta B: Are there two sides to colorectal cancer? Int J Cancer 2002, 101:403-8.

- [10] Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, et al : The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2016, 20:648-55.
- [11] Sugai T, Habano W, Jiao YF, et al : Analysis of molecular alterations in left- and right-sided colorectal carcinomas reveals distinct pathways of carcinogenesis: proposal for new molecular profile of colorectal carcinomas. *J Mol Diagn* 2006, 8:193-201.
- [12] Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, et al : Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol* 2011, 29:4401-9.
- [13] Nawa T, Kato J, Kawamoto H, et al : Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23:418-23.
- [14] Kim YH, Min BH, Kim SJ, et al : Difference between proximal and distal microsatellite-unstable sporadic colorectal cancers: analysis of clinicopathological and molecular features and prognoses. *Ann Surg Oncol* 2010, 17:1435-41.
- [15] Richman S, Adlard J: Left and right sided large bowel cancer. *BMJ* 2002, 324:931-2.
- [16] Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, et al : Is there a difference in survival

between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 2008, 15:2388-94.

[17] Minoo P, Zlobec I, Peterson M, et al : Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int J Oncol* 2010, 37:707-18.

[18] Rauch A, Ruschendorf F, Huang J, et al : Molecular karyotyping using an SNP array for genomewide genotyping. *J Med Genet* 2004, 41:916-22.

[19] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al : Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006, 444:444-54.

[20] Saeki H, Kitao H, Yoshinaga K, et al : Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. *Clin Cancer Res* 2011, 17:1731-40.

[21] 大腸癌研究会: 大腸癌取り扱い規約 第8版. 2013.

[22] Ferretti S, Patriarca S, Carbone A, et al : [TNM classification of malignant tumours, VII edition 2009. Changes and practical effects on cancer epidemiology]. *Epidemiol Prev* 2010, 34:125-8.

[23] Arai T, Kino I: Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta Pathol Jpn* 1989, 39:725-30.

- [24] Evans GS, Flint N, Somers AS, et al : The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. J Cell Sci 1992, 101 (Pt 1):219-31.
- [25] Nakamura S, Goto J, Kitayama M, et al : Application of the crypt-isolation technique to flow-cytometric analysis of DNA content in colorectal neoplasms. Gastroenterology 1994, 106:100-7.
- [26] Habano W, Sugai T, Nakamura S, et al : A novel method for gene analysis of colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. Lab Invest 1996, 74:933-40.
- [27] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al : A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998, 58:5248-57.
- [28] Azzoni C, Bottarelli L, Cecchini S, et al : Sporadic colorectal carcinomas with low-level microsatellite instability: a distinct subgroup with specific clinicopathological and molecular features. Int J Colorectal Dis 2011, 26:445-53.
- [29] Sugai T, Habano W, Nakamura S, et al : A unique method for mutation analysis of tumor suppressor genes in colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. Arch Pathol Lab Med 2000, 124:382-6.

- [30] Zhu K, Yan H, Wang R, et al : Mutations of KRAS and PIK3CA as independent predictors of distant metastases in colorectal cancer. *Med Oncol* 2014, 31:16.
- [31] Yagi K, Takahashi H, Akagi K, et al : Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am J Pathol* 2012, 180:616-25.
- [32] Kaneda A, Yagi K: Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* 2011, 102:18-24.
- [33] Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, et al : Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2013, 52:140-9.
- [34] Zhao Y, Oki E, Ando K, et al : The impact of a high-frequency microsatellite instability phenotype on the tumor location-related genetic differences in colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010, 196:133-9.
- [35] Kinzler KW, Vogelstein B: Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998, 280:1036-7.
- [36] Uchi R, Takahashi Y, Niida A, et al : Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet* 2016, 12:e1005778.
- [37] Arai T, Takubo K, Sawabe M, et al : Pathologic characteristics of colorectal cancer

in the elderly: a retrospective study of 947 surgical cases. *J Clin Gastroenterol* 2000, 31:67-72.

[38] Sugai T, Habano W, Uesugi N, et al : Molecular validation of the modified Vienna classification of colorectal tumors. *J Mol Diagn* 2002, 4:191-200.

[39] Park SY, Lee HS, Choe G, et al : Clinicopathological characteristics, microsatellite instability, and expression of mucin core proteins and p53 in colorectal mucinous adenocarcinomas in relation to location. *Virchows Arch* 2006, 449:40-7.

[40] Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM: Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2010, 7:493-507.

[41] Siddiqui AD, Piperdi B: KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol* 2010, 17:1168-76.

[42] Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, et al : Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol* 2000, 95:2953-7.

[43] Brule SY, Jonker DJ, Karapetis CS, et al : Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *Eur J Cancer* 2015, 51:1405-14.

[44] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al : CpG island methylator phenotype in

colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:8681-6.

[45] Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al : Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:18654-9.

[46] Leggett B, Whitehall V: Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010, 138:2088-100.

[47] Ziemke EK, Dosch JS, Maust JD, et al : Sensitivity of KRAS-Mutant Colorectal Cancers to Combination Therapy That Cotargets MEK and CDK4/6. *Clin Cancer Res* 2016, 22:405-14.

[48] Kato S, Schwaederle M, Daniels GA, et al : Cyclin-dependent kinase pathway aberrations in diverse malignancies: clinical and molecular characteristics. *Cell Cycle* 2015, 14:1252-9.

[49] Murria R, Palanca S, de Juan I, et al : Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *Am J Cancer Res* 2015, 5:375-85.

[50] Perraud A, Nouaille M, Akil H, et al : Retinoid acid receptors in human colorectal cancer: An unexpected link with patient outcome. *Exp Ther Med* 2011, 2:491-7.

[51] Zhang YJ, Li AJ, Han Y, et al : Inhibition of Girdin enhances chemosensitivity of

colorectal cancer cells to oxaliplatin. *World J Gastroenterol* 2014, 20:8229-36.

[52] Puyol M, Martin A, Dubus P, et al : A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2010, 18:63-73.

[53] Kwong LN, Costello JC, Liu H, Jiang S, et al : Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat Med* 2012, 18:1503-10.

[54] Cole AM, Myant K, Reed KR, et al : Cyclin D2-cyclin-dependent kinase 4/6 is required for efficient proliferation and tumorigenesis following Apc loss. *Cancer Res* 2010, 70:8149-58.

[55] Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, et al : Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014, 20:18151-64.

10. 図, および図の説明

図 1-1. MSS 型右側癌 15 例の発生部位別の copy number alteration (CNA). 各染色体別の CNA の頻度を示す. 各染色体の縦軸は染色体領域, 横軸は CNA の頻度 (%) であり, gain, LOH, copy-neutral LOH をそれぞれ緑, 赤, 灰色で表している.

図 1-2. MSS 型左側癌 56 例の発生部位別の copy number alteration (CNA). 各染色体別の CNA の頻度を示す. 各染色体の縦軸は染色体領域, 横軸は CNA の頻度 (%) であり, gain, LOH, copy-neutral LOH をそれぞれ緑, 赤, 灰色で表している.

図 2. MSS 型大腸癌における copy number alteration (CNA) 領域の DNA サイズの総和. 発生部位別に overall, gain, LOH および copy-neutral LOH について比較した. グラフの縦軸はそれぞれの DNA サイズの総和 (bp) を表している.

図 3. MSS 型右側癌の 1 例. A. 上行結腸に生じた 37x28mm の 2 型腫瘍である. B. ルーペ像では漿膜下層まで浸潤する進行癌である. C. 腫瘍中心部の検体採取部位近傍では篩状腺管構造主体の中分化型管状腺癌を示す (ヘマトキ

シリン・エオジン染色，200 倍）。D. 実体顕微鏡下で腺管分離法によって分離された癌腺管を示す。E. 分離された癌腺管は篩状腺管構造を示す中分化型管状腺癌である。間質組織の混入は認められない（ヘマトキシリン・エオジン染色，200 倍）。F. PCR-MSI 解析は全てのマーカーが陰性で MSI-negative と判定した。G. 変異解析は *KRAS* 遺伝子の Codon 13 に CGC から GAC への変異を 50% 認めた。H. DNA メチル化解析結果を示す。第 1 パネルの *LOX*, *MINT31*, *RUNX3* のうち *MINT31* のみがメチル化陽性，第 2 パネルの *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1* は全てメチル化陽性を示すことから IME に分類される。I. CNA 解析結果を示す。1 から 22 番染色体の CNA 出現領域を示し，gain, LOH, copy-neutral LOH をそれぞれ緑，赤，灰色で表している。

図 4. MSS 型左側癌の 1 例。A. S 状結腸に生じた 95x80mm の 2 型腫瘍である。B. ルーペ像では漿膜下層まで浸潤する進行癌である。C. 腫瘍中心部の検体採取部位近傍では篩状腺管構造主体の中分化型管状腺癌を示す（ヘマトキシリン・エオジン染色，200 倍）。D. 実体顕微鏡下で腺管分離法によって分離された癌腺管を示す。E. 分離された癌腺管は篩状腺管構造を示す中分化型管状腺癌である。間質組織の混入は認められない（ヘマトキシリン・エオジン染色，200 倍）。F. PCR-MSI 解析は全てのマーカーが陰性で MSI-negative と判定した。

G. 変異解析では *TP53* 遺伝子の 9bp deletion, *PIK3CA* 遺伝子の GAG から GCG への変異を認める. H. DNA メチル化解析結果を示す. 第 1 パネルの *LOX*, *MINT31*, *RUNX3* は全てメチル化陰性, 第 2 パネルの *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1* のうち *THBD*, *NEUROG1* がメチル化陽性を示すことから IME に分類される.

I. CNA 解析結果を示す. 1 から 22 番染色体の CNA 出現領域を示し, gain, LOH, copy-neutral LOH をそれぞれ緑, 赤, 灰色で表している.

表 1. PCR-MSI 解析のプライマー

プライマー		
BAT25	Forward	5'- TCGCCTCCAAGAATGTAAGT - 3'
	Reverse	5'- TCTGCATTTTAACTATGGCTC - 3'
BAT26	Forward	5'- TGACTACTTTTGACTTCAGCC - 3'
	Reverse	5'- AACCATTCAACATTTTAAACCC - 3'
D2S123	Forward	5'- GGATGCCTGCCTTTAACAGT - 3'
	Reverse	5'- GACTTTCCACCTATGGGACT - 3'
D5S346	Forward	5'- ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG - 3'
	Reverse	5'- AGCAGATAAGACAAGTATTACTAGTT - 3'
D17S250	Forward	5'- GGAAGAATCAAATAGACAAT - 3'
	Reverse	5'- GCTGGCCATATATATATTTAAACC - 3'

表 2. 変異解析 *TP53*, *PIK3CA* のプライマー

プライマー		
<i>TP53</i> exon5	Forward	5'- CAACTCTGTCTCCTTCCTCT - 3'
	Reverse	5'- TCTCCAGCCCCAGCTGCTC- 3'
<i>TP53</i> exon6	Forward	5'- GATTCCTCACTGATTGCTCTT - 3'
	Reverse	5'- AGACCCCAGTTGCAAACCAG - 3'
<i>TP53</i> exon7	Forward	5'- TTGGGCCTGTGTTATCTCCT - 3'
	Reverse	5'- TGCAGGGTGGCAAGTGGCT - 3'
<i>TP53</i> exon8	Forward	5'- GCTTCTCTTTTCCTATCCTGA - 3'
	Reverse	5'- GCTTCTTGTCTCTGCTTGCTT - 3'
<i>PIK3CA</i> exon9	Forward	5'- TCTGTAAATCATCTGTGAATCC - 3'
	Reverse	5'- GAAAAAGAAACAGAGAATCTCC - 3'
<i>PIK3CA</i> exon20	Forward	5'- TCATTTGCTCCAAACTGACC - 3'
	Reverse	5'- TCCATTTTGTGTGCCAGCC - 3'

表 3. DNA メチル化解析のプライマー

プライマー		
<i>LOX</i>	Forward	5'- GGGTTAATTTGGTAAAAGGAGTG - 3'
	Reverse	5'- ACCTACCCCTTATTCTCCCATTAATCTAC - 3'
	sequencing	5'- ATTTGGTAAAAGGAGTGA - 3'
<i>MINT31</i>	Forward	5'- GAYGGYGTAGTAGTTATTTTGTT - 3'
	Reverse	5'- CATCACCACCCCTCACTTTAC - 3'
	sequencing	5'- TGTAGTTTTAGGAGAGTGAATA - 3'
<i>RUNX3</i>	Forward	5'- GGGTATTTTTTATTTTTATTGT - 3'
	Reverse	5'- ACAACCCCAACTTCCTCTA - 3'
	sequencing	5'- GTATTTATTTTGAAGG - 3'
<i>ELMO1</i>	Forward	5'- ATGGGTATAGGATAGAGGTAGAG - 3'
	Reverse	5'- ACCCATCACAACTTCCTTTAT - 3'
	sequencing	5'- GGGTAGTAGGAGTTTTGAT - 3'
<i>THBD</i>	Forward	5'- TGGGTTGGGAAGGATAGGAGAG - 3'
	Reverse	5'- AAACCCCAAACATATTACCCA - 3'
	sequencing	5'- GGATAGGAGAGGTTG - 3'
<i>NEUROG1</i>	Forward	5'- TGGTTAGGGAGTTTTTAGGTTAGTGAA - 3'
	Reverse	5'- ACTCCAAATACCCTCCAAATTC - 3'
	sequencing	5'- GTTTTTAGGTTAGTGAAATAGAG - 3'

表 4. 大腸癌 92 例の PCR-MSI 解析

	右側大腸癌 n = 31 (%)	左側大腸癌 n = 61 (%)	<i>P</i> 値
MSI- high [†]	12 (38.7)	2 (3.3)	< 0.001
MSI- low ^{††}	4 (12.9)	3 (4.9)	
MSS ^{†††}	15 (48.4)	56 (91.8)	

[†] ; MSI-high ; Microsatellite instability-high

^{††} ; MSI-low ; Microsatellite instability-low

^{†††} ; MSS ; Microsatellite stable

表 5. MSS 型大腸癌 71 例の発生部位別の臨床病理学的特徴

	MSS 型右側癌 n = 15 (%)	MSS 型左側癌 n = 56 (%)	P 値
年齢 [†]			
中央値 (歳)	76 (63 - 90)	68 (39 - 87)	0.01
性別			
男性	5 (33.3)	33 (58.9)	NS
女性	10 (66.7)	23 (41.1)	
組織型			
高分化型腺癌	1 (6.7)	1 (1.8)	NS
中分化型腺癌	14 (93.3)	55 (98.2)	
その他 ^{††}	0 (0)	0 (0)	
リンパ管侵襲			
無し / 軽度	15 (100)	52 (89.3)	NS
高度	0 (0)	4 (7.1)	
静脈侵襲			
無し / 軽度	13 (86.7)	50 (89.3)	NS
高度	2 (13.3)	6 (10.7)	
TNM stage			
I	2 (13.3)	9 (16.1)	NS
II	3 (20.0)	16 (28.5)	
III	7 (46.7)	23 (41.1)	
IV	3 (20.0)	8 (14.3)	

[†] ; 年齢は中央値 (最小値 - 最大値) で表した. その他の数値は症例数を示す.

^{††} ; 組織型のその他には粘液癌または乳頭腺癌を含む.

統計学的有意差がないものは NS (Not significant) とした.

表 6. MSS 型大腸癌 71 例の発生部位別の遺伝子変異

	MSS 型右側癌 n = 15 (%)	MSS 型左側癌 n = 56 (%)	<i>P</i> 値
<i>TP53</i> 陽性	3 (20.0)	33 (58.9)	0.006
<i>KRAS</i> 陽性	11 (73.3)	16 (28.6)	0.001
<i>BRAF</i> 陽性	0 (0)	1 (1.8)	NS
<i>PIK3CA</i> 陽性	1 (6.7)	5 (8.9)	NS

統計学的有意差がないものを NS (Not significant) とした.

表 7. MSS 型大腸癌 71 例の発生部位別の DNA メチル化状態

	MSS 型右側癌 n = 15 (%)	MSS 型左側癌 n = 56 (%)	P 値
高メチル化状態	0 (0)	3 (5.3)	NS
中等度メチル化状態	11 (73.3)	28 (50.0)	
低メチル化状態	4 (26.7)	25 (44.7)	

統計学的有意差がないものを NS (Not significant) とした.

表 8. MSS 型大腸癌 71 例の発生部位別の CNA 高頻度領域

MSS 型右側癌 n = 15 (%)			MSS 型左側癌 n = 56 (%)		
遺伝子座			遺伝子座		
Gain [†]	13q12.13-12.3	9 (60.0)	Gain [†]	8p11.1-11.23	28-35 (50.0-62.5)
	20q13.33	9 (60.0)		8q	31-38 (55.3-67.8)
	7p21.1-21.2	8 (53.3)		20p	28-33 (50.0-58.9)
	7q31.33	8 (53.3)		20q	36-38 (64.2-67.8)
	8q11.21-13.3	8 (53.3)		13q	29-36 (51.7-58.9)
	13q12.11-12	8 (53.3)		7p	29-33 (51.7-58.9)
	20q11.21-13.32	8 (53.3)		7q11-21.11	33-35 (58.9-62.5)
				7q21.12-36.3	28-31 (50.0-55.9)
LOH ^{††}	18q21.1-22.3	9 (60.0)	LOH ^{††}	8p12-23.1	28-29 (50.0-51.7)
	18q11.2-12.3	8 (53.3)		17p11.2-13.1	28 (50.0)
	18p11.21-32	8 (53.3)		18p	32-34 (57.1-60.7)
				18q	33-38 (58.9-67.8)
Copy-neutral LOH ^{†††}		None	Copy-neutral LOH ^{†††}		None

[†] ; Gain ; Chromosomal gain

^{††} ; LOH ; Chromosomal loss of heterozygosity

^{†††} ; Copy-neutral LOH ; Chromosomal copy-neutral loss of heterozygosity

表 9. MSS型大腸癌 71 例の発生部位による CNA 出現頻度が異なる領域

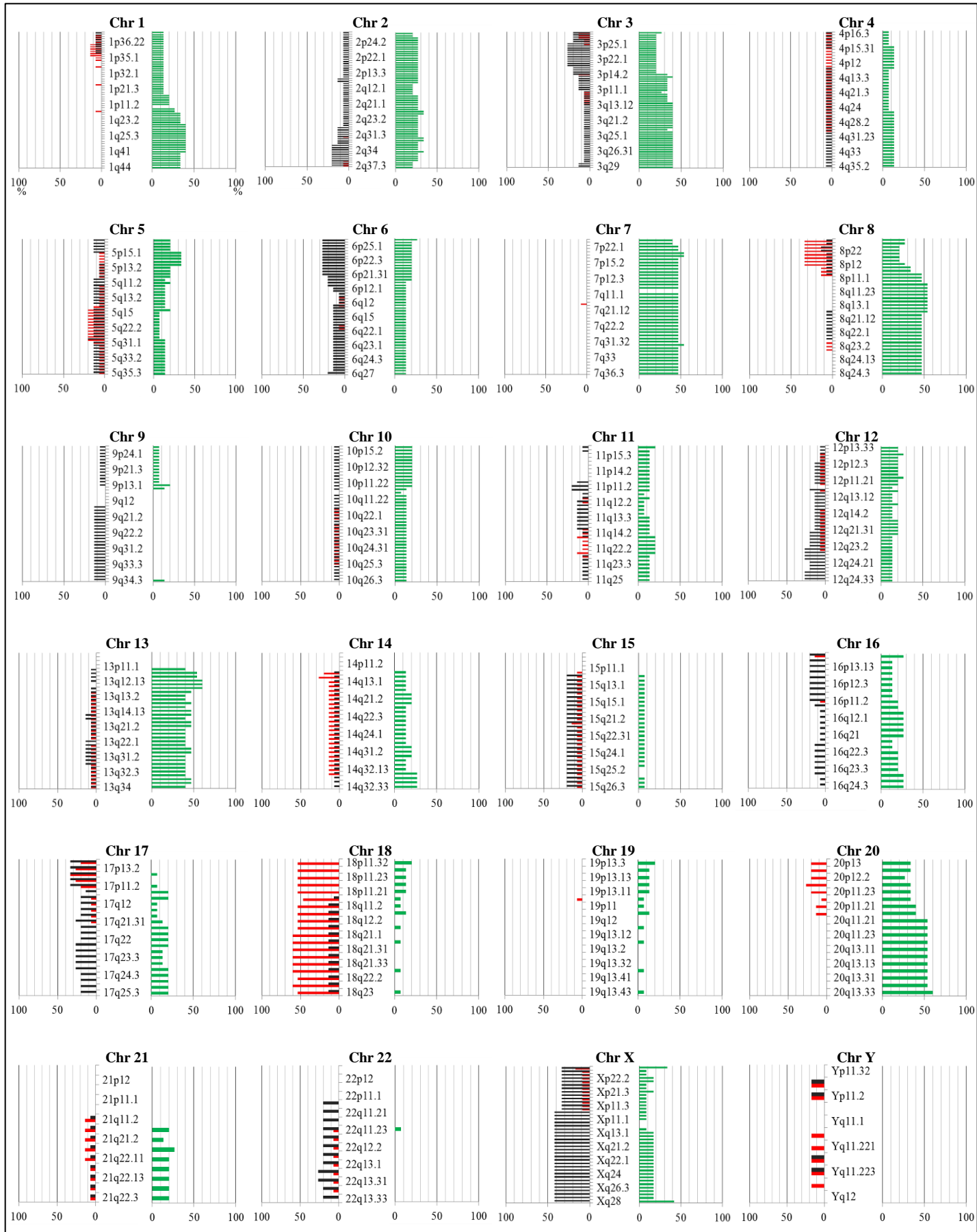
	遺伝子座	MSS 型右側癌 n = 15 (%)	MSS 型左側癌 n = 56 (%)	P 値
Gain [†]	10q21.1	2 (13.3)	27 (48.2)	0.03
	10q21.3	2 (13.3)	27 (48.2)	0.03
	12q14.1	2 (13.3)	27 (48.2)	0.03
	12q14.2	2 (13.3)	27 (48.2)	0.03
	9q21.11	0	17 (30.3)	0.04
	9q21.12	0	17 (30.3)	0.04
	9q21.33	0	17 (30.3)	0.04
	9q22.1	0	17 (30.3)	0.04
	9q22.31	0	17 (30.3)	0.04
	9q22.32	0	17 (30.3)	0.04
LOH ^{††}		None		
Copy-neutral LOH ^{†††}	3p24.2	5 (33.3)	3 (5.3)	0.01
	3p24.3	5 (33.3)	4 (7.1)	0.02
	16p12.1	3 (20.0)	1 (1.7)	0.04
	16p13.2	3 (20.0)	1 (1.7)	0.04

[†] ; Gain ; Chromosomal gain

^{††} ; LOH ; Chromosomal loss of heterozygosity

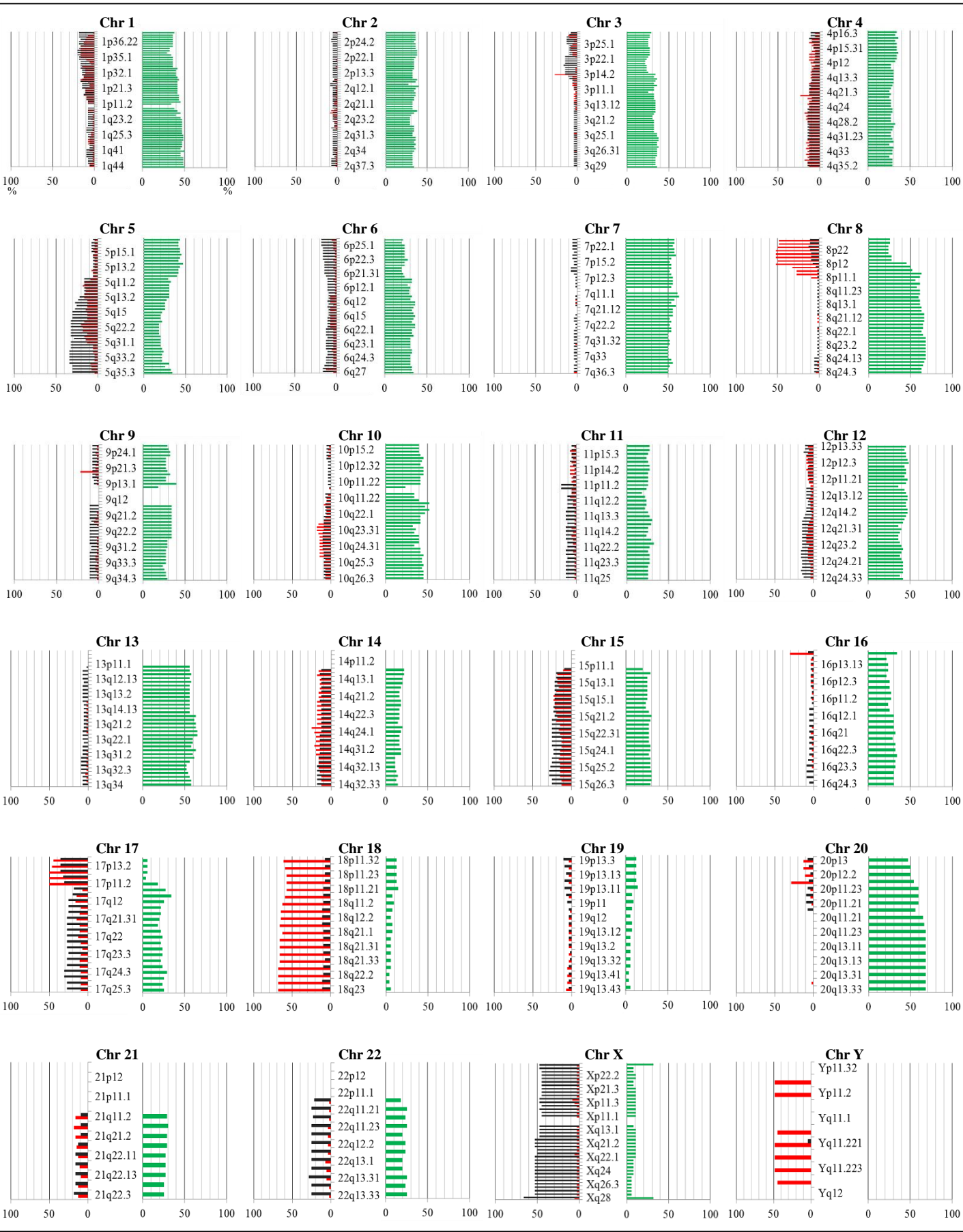
^{†††} ; Copy-neutral LOH ; Chromosomal copy-neutral loss of heterozygosity

図 1-1. MSS 型右側癌の発生部位別の copy number alteration



Green : Gain Red : LOH Grey : Copy neutral LOH

図 1-2. MSS 型左側癌の発生部位別の copy number alteration



Green : Gain Red : LOH Grey : Copy neutral LOH

図 2. MSS 型大腸癌における copy number alteration 領域の DNA サイズの総和

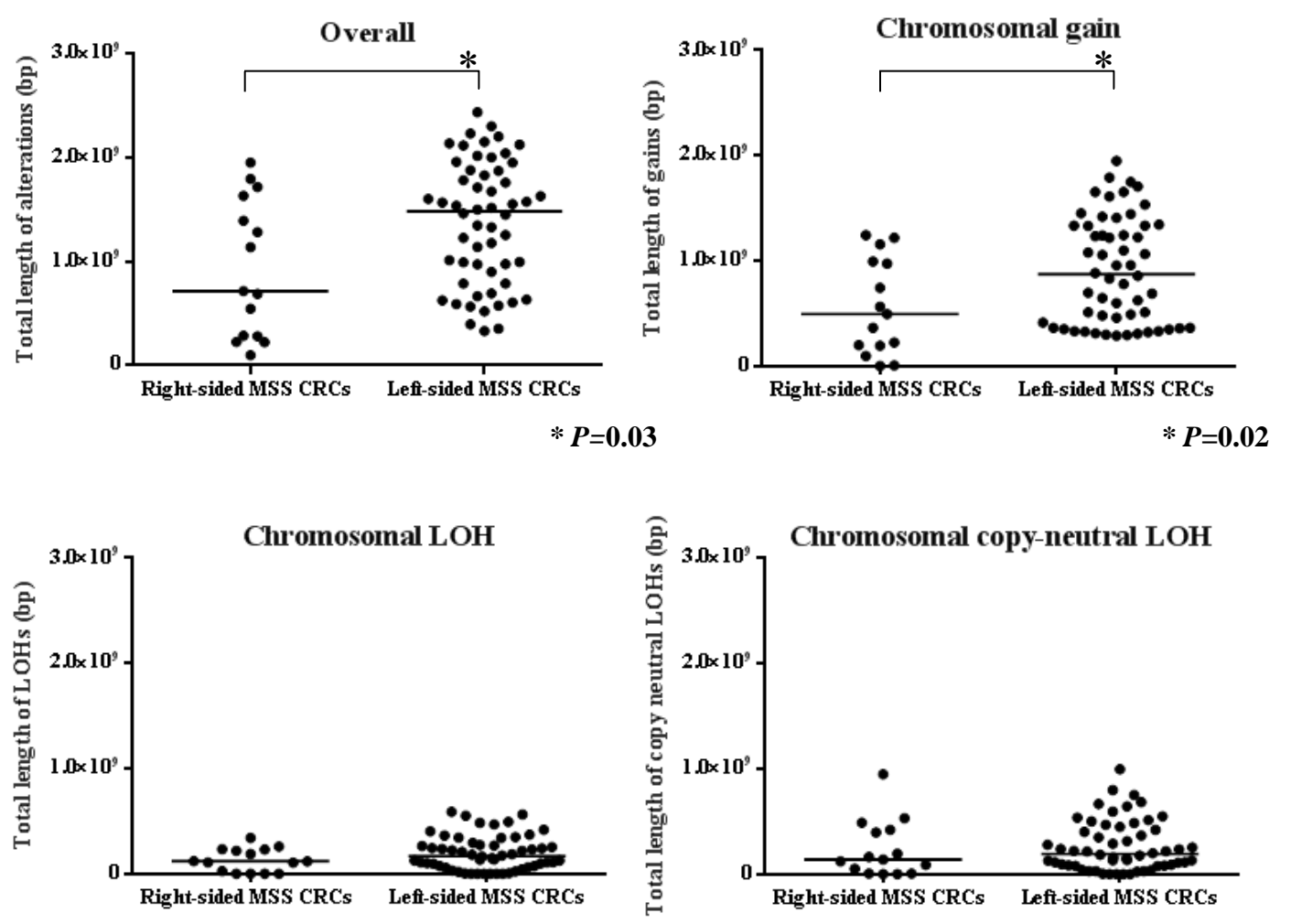


図 3. MSS 型右側癌の 1 例

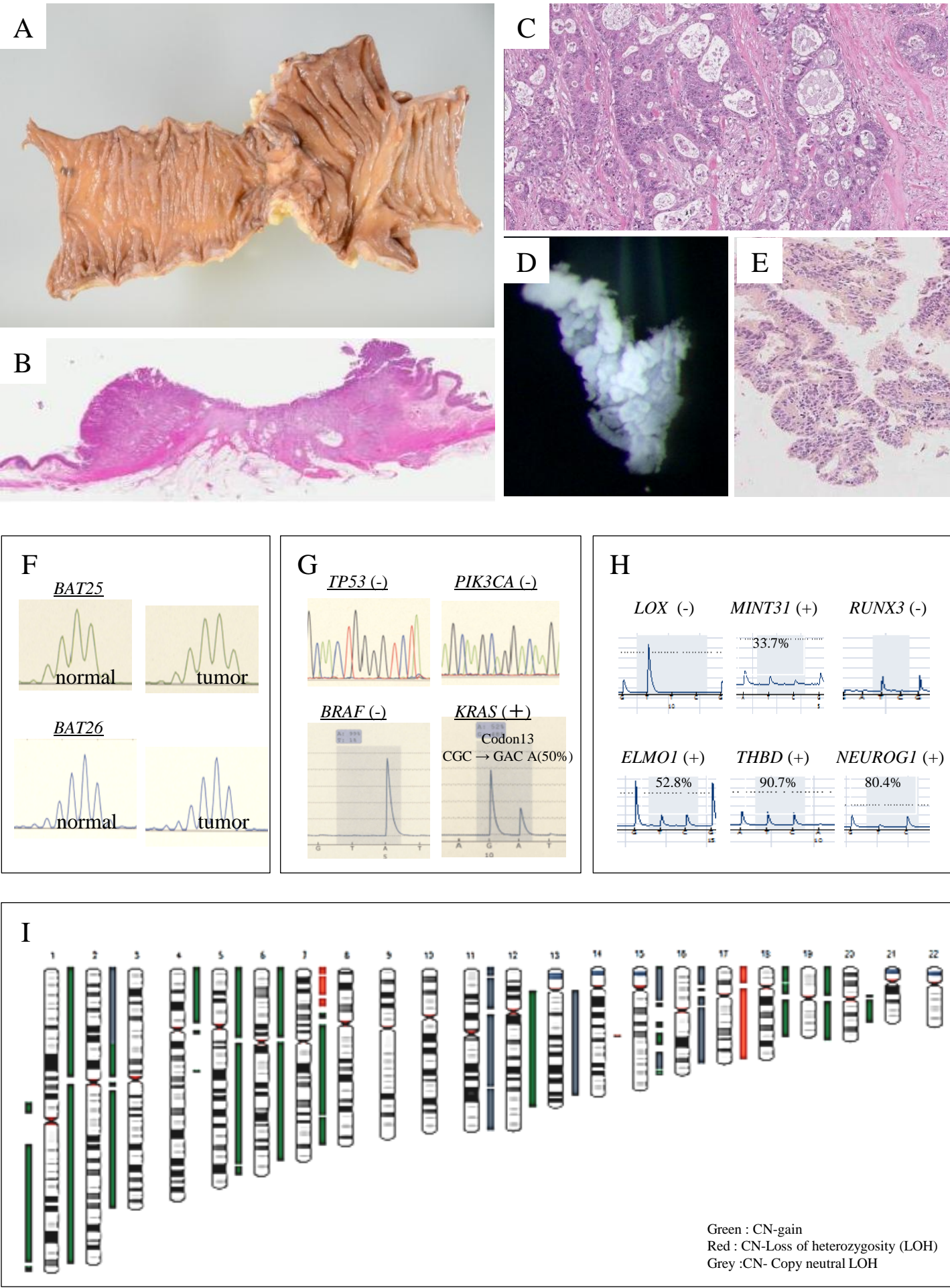


図 4. MSS 型左側癌の 1 例

